利用一对多尿液蛋白质组比较为发热待查提供线索

赵晨阳[1#] 魏利龙[2#] 魏静[1] 高友鹤[1*]
[1]（北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100871）
[2]（北京中日友好医院 北京 100029）

摘要：
[目的] 通过尿液蛋白质组学分析为发热待查患者提供线索和诊断依据。
[方法] 利用液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）对发热待查患者的尿液进行分析，采用一对多的分析方法，即一个病人和一组健康人样本对比分析，鉴定差异蛋白以及其相关的生物学通路。
[结果] 在尿液样本中，我们能看到与发热有关的生物学通路，比如 LXR/RXR 激活、FXR/RXR 激活、急性期反应等，说明尿液可以明显区分疾病与健康状态；同时每个患者的分析结果都不同，凸显一对多分析的必要性。
[结论] 尿液蛋白质组学和一对多分析相结合，能为发热待查提供线索，也可能应用于任何未知疾病的探索。
关键词：蛋白质组学；尿液；发热待查

Using one-to many urine proteome comparison to provide clues for fever of unknown origin

Zhao Chenyang[1#] Wei Lilong[2#] Wei Jing[1] Gao Youhe[1]
[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)
[2] (China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract:
[Objective] Provide diagnostic evidence and clues for patients with fever of unknown origin (FUO) through urine proteomics analysis.
[Methods] Urine samples of FUO were one-to-many analysised by using liquid chromatograpgy tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) to identify differential proteins and related biological pathways. One-to-many analysis means a comparative analysis of one sample to many controls.
[Results] We can see some biological pathways related to fever, such as LXR/RXR activation, FXR/RXR activation and acute Phase Response Signaling, etc., indicating that urine can obviously distinguish disease from health status. The results of each patient are different, highlighting the necessity of one-to-many analysis.
[Conclusions] The combined method of urine proteomics and one-to-many analysis can provide clues for FUO, and maybe also be applied to the exploration of any unknown disease.
Keywords: proteomics; urine; fever of unknown origin

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202 和 2016YFC1306300）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002)；北京自然科学基金（7172076）；北京合作建设项目（110651103）；北京师范大学（11100704）
作者简介：1.赵晨阳（1998.03—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物.2.魏利龙（1980.08—），男，主治医师.（#表示共同第一作者）
通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

0 引言

发热是医学临床表现中普遍存在的一个现象，自 1961 年发热待查（fever of unknown origin, FUO）的概念首次被提出[1]，到现在的 60 年间，发热待查一直是医学诊断领域亟待解决的问题。发热待查是指连续发热 3 周以上，体温多次超过 38.3，经过至少一周的时间多次检查仍不能确认的一类疾病。据有关文献报道，能引起发热的病因多达 200 多种，比如细菌或病毒的感染、肿瘤性疾病等等[2]。尽管医疗诊断技术在不断发展，但是对于发热患者的确切诊断还存有一些疑问，未能确定病因就难以对症下药，盲目用药又可能会耽误病情，同时也是医疗资源的一种浪费。综合以上的问题，为发热患者提供新的诊断方式，为诊断提供线索，帮助诊断的产生和验证是我们面临的一个挑战。

尿液是机体排泄代谢废物的一种途径，由于没有稳态调节机制的影响，尿液能反映机体产生的微小变化，比血液更早期、更敏感[3]。目前已有大量的研究表明，尿液是疾病生物标志物的良好来源，比如在皮下注射 Walker-256 细胞构建的荷瘤大鼠模型中，通过监测癌症发展进程和尿蛋白发现，尿蛋白随着肿瘤的生长而发生改变[4]，同时向大鼠尾静脉注射 Walker-256 细胞的研究发现，当肿瘤在不同器官生长时，尿蛋白质组也不相同[5]，表示出尿液的鉴别诊断能力；又比如在药物诱导的慢性胰腺炎大鼠模型研究中发现，在病理发生可视化变化之前，被报道与胰腺炎相关的尿蛋白就已经发生了显著改变[6]，这反映了尿液的早期性和高度灵敏性；这些都为尿液的早期诊断提供了依据。

在本研究中，我们采取的是一对多分析的方法，即一个病人和一组健康人样本对比分析的方法。我们认为对于未知疾病的研究，很难把病人们列为一组进行分析和比较，因为疾病的未知性，我们没有确切根据能对病人的特点进行分组。在实际临床应用中，医生们往往根据一个人不同于大众的表现来评判是否患病，换一种说法就是让一个人和所有的正常人做对比，超出正常的范围就有患病的可能。虽然正常人之间也存在差异，但这些差异都是在一个正常范围内波动的，通过组内的均一化处理，会得到一个和正常人更接近的参数。当未知疾病病人的多个蛋白被发现和这个参数有差异时，我们就可以通过差异蛋白现有的生物信息学方法来找到异常的生物学过程，甚至是受损器官等，由此来对未知疾病进行推断。因此，我们对每一位发热待查患者的尿液进行了非标记定量蛋白质组学的分析，旨在通过差异蛋白来寻找与疾病相关的生物学通路，为发热待查的临床诊断提供线索和依据。

1 材料和方法

1.1 患者样本的收集

总共收集了来自北京中日友好医院的 13 位入院时发热患者的 13 个尿液样本，尿液样本均为晨尿。本次实验基于检验科的废弃样本再利用，其过程未涉及病人的任何身份信息，我们没有影响病人的任何治疗，也没有推荐给病人进行任何的临床和辅助检查。本研究所产生的知识都处于研究阶段，只为获取发热待查线索。

其中 2 份尿样（1、2 号）检验异常，经临床核实有尿蛋白现象，不符合本次取样标准，故排除。患者入院时均有发热现象（体温≥37.3℃）。尿液样本采集当天，患者体温记录于表 1。所有参与者均已签署知情同意书，且该研究已获得中日友好医院的伦理学批准（编号：2019-42-K30）。

表 1 患者临床特征记录

患者编号	性别	年龄	收样时体温/℃
F1	女	60	38.8
F2	女	81	38.4
F3	男	60	37.3
F4	男	73	37.8
F5	男	72	36.0
F6	男	64	36.6
F7	男	32	36.5
F8	男	71	36.8
F9	女	53	36.6
F10	男	88	36.8
F11	女	32	36.9

1.2 尿液样品的处理

尿蛋白提取：收集的尿液样本暂存在-80℃冰箱备用。首先进行尿液蛋白质的提取：取出 4ml 尿样解冻，4℃，12000×g 条件下离心 20 分钟，去除细胞碎片，取上清液加入 20 mM 的二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT, Sigma），混匀后金属浴 99.2℃加热 10 分钟，晾凉至室温后加入 50 mM 的碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），混匀后常温避光反应 40 分钟。反应结束后，将样本转移至新的离心管中与四倍体积的预冷无水乙醇充分混合，置于-20℃冰箱中 24 小时沉淀蛋白。沉淀结束，4℃，10000×g 条件下离心 30 分钟后，弃去上清，吹干蛋白沉淀，向干燥蛋白沉淀中加入适量裂解液（8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，50 mmol/L Tris 和 25 mmol/L DTT）复溶。复溶后的样品离心后保留上清液，采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：采用 FASP 法将尿蛋白膜上辅助酶切[7]。定量 100ug 尿蛋白加入 10kD 超滤管（Pall, Port Washington, NY, USA）的滤膜上，使用 UA 溶液（8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl,pH8.5）和 25 mmol/L NH4HCO3 溶液分别洗涤两次，以胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃孵育过夜。过夜后离心收集酶解后的滤液即为多肽混合液。收集到的多肽混合液通过 Oasis HLB 固相萃取柱（Waters, Milford, MA）进行除盐处理后真空干燥，置于-80℃保存。

1.3 LC-MS/MS 串联质谱分析

用 0.1%的甲酸水复溶肽段，使用 BCA 试剂盒对肽段浓度进行测定，将肽段浓度稀释至 0.5μg/μL。使用 1μg 多肽样本通过 Thermo ESAY-Nlc1200 液相系统进行分离，参数设定如下：洗脱时间 90 分钟，洗脱梯度为（流动相 A：0.1%甲酸；流动相 B：80%乙腈）。洗脱下来的肽段通过 Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪（Thermo Fisher Scientific, USA）进行检测，使用数据非依赖型采集模式。

1.4 数据分析

质谱仪采集到的数据 raw 文件，通过 Proteome Discoverer 2.1 软件（Thermo Fisher Scientific, USA）转为 mgf 格式文件，并导入到 Mascot 软件中进行数据检索，数据库：Swissprot，物种：Home sapiens Human, 质谱数据检索为蛋白。检索条件设置为：胰酶酶切：允许 2 个漏切位点；半胱氨酸为固定修饰；甲硫氨酸的氧化和蛋白质 N-末端乙酰化为可变修饰；多肽母离子和子离子的质量偏差均为 0.05Da，母离子质量容差为 10ppm。检索完成后，导出 dat 格式文件，使用 Scaffold 软件进行蛋白质控和打分，参数设置为：蛋白 FDR 为 1%，多肽 FDR 为 1%，每个蛋白至少包含 2 条特异性多肽，总谱图数进行标准化，根据标准化后的二级谱图数进行后续分析。

1.5 统计分析

我们应用谱图数定量法来进行差异蛋白的筛选。筛选条件：Fold change≥2 或≤0.5，配对 t 检验分析的 P 值校正值＜0.05。后续通过 Ingenuity Pathway Analysis 软件通路分析以及 Pubmed 数据库已报道文献检索等对差异蛋白进行功能分析。

2 结果和讨论

2.1 单个患者尿蛋白质组分析

（1） F1 患者尿蛋白质组分析

将 F1 患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 108 个差异蛋白，分别有 85 个上调蛋白和 23 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 分析，获得的经典途径结果如表 2 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在 LXR/RXR 激活、急性期反应、抗原呈递、FXR/RXR 激活、吞噬体成熟、叶酸聚谷氨酰化、丝氨酸和甘氨酸生物合成途径、

蔗糖降解、蛋白泛素化等信号通路；据相关文献报道，急性期反应[8]信号通路与发热有关；LXR/RXR (liver X receptor/retinoid X receptor)和 FXR/RXR(farnesoid X receptor/retinoid X receptor)通常存在于参与葡萄糖和脂质稳态以及炎症反应的生物学和病理学途径中[9]；抗原呈递与吞噬体成熟都和免疫过程有很大的关系；同时 3 号患者在样本收集时正处于发热的急性反应状态（体温 38.8℃）。这些结果表明，尿蛋白反映的变化与临床表现有一致性，我们可以从尿液中发现发热的线索。

表 2 F1 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F1	LXR/RXR Activation	1.95E-07	AGT, APOC3, C9, CD14, HPX, LBP, ORM1, ORM2
	Acute Phase Response Signaling	3.72E-07	AGT, C9, CRP, FTL, HPX, LBP, ORM1, ORM2, SERPINA3
	Antigen Presentation Pathway	3.89E-05	B2M, CANX, HLA-DRA, HLA-DRB1
	FXR/RXR Activation	3.98E-05	AGT, APOC3, C9, HPX, ORM1, ORM2
	Phagosome Maturation	1.05E-04	B2M, CANX, CTSS, CTSZ, HLA-DRA, HLA-DRB1
	Folate Polyglutamylation	2.45E-04	MTHFD1, SHMT1
	Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	5.13E-04	PSAT1, SHMT1
	Sucrose Degradation V (Mammalian)	6.76E-04	KHK, TKFC
	Folate Transformations I	8.71E-04	MTHFD1, SHMT1
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.69E-03	AGT, CD14, COL5A3, LBP, MMP2
	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	2.82E-03	APOC3, ARPC4, DNM2, ORM1, ORM2
	Atherosclerosis Signaling	3.72E-03	APOC3, COL5A3, ORM1, ORM2
	Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	3.98E-03	AKR1A1, DDC
	TCA Cycle II (Eukaryotic)	6.31E-03	ACO1, MDH1
	Apelin Liver Signaling Pathway	7.41E-03	AGT, COL5A3
	Ovarian Cancer Signaling	7.94E-03	FSHB, MMP2, MMP7, SMO
	Aldosterone Signaling in Epithelial Cells	8.71E-03	AHCY, CRYAB, HSPB11, SMO
	Dendritic Cell Maturation	9.12E-03	B2M, CD58, COL5A3, HLA-DRA, HLA-DRB1, IGHG3
	Glycine Biosynthesis I	1.00E-02	SHMT1
	Protein Ubiquitination Pathway	1.15E-02	B2M, CRYAB, HSPB11, PSMC5, SMO

（2） F2 患者尿蛋白质组分析

将 F2 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 174 个差异蛋白，分别有 131 个上调蛋白和 43 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 分析，获得的经典途径结果如表 3 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在吞噬体成熟、抗原呈递、LXR/RXR 激活、PD-1、PD-L1 肿瘤免疫治疗途径、Th1 和 Th2 激活通路、FXR/RXR 激活、急性期反应、病毒通过内吞进入细胞途径、NK 细胞信号、B 细胞发育等通路。除了之前提到过的与炎症有关的信号通路，F2 患者更多表现出了与病毒和免疫有关的信号，比如 NK 细胞、B 细胞的信号通路；病毒内吞进入细胞的过程，这说明 F2 患者很有可能是病毒入侵导致的发热，随后我们对病毒序列进行了搜索，没有找到明确的致病病毒，需要进一步检查对病毒进行考证。

表 3 F2 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F2	Phagosome Maturation	2.14E-10	B2M, CANX, CTSB, CTSC, CTSD, CTSH, CTSS, CTSZ, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, VPS28

	Antigen Presentation Pathway	1.82E-08	B2M, CANX, CD74, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA
	LXR/RXR Activation	6.31E-07	AGT, APOC2, APOC3, CD14, FGA, LCAT, ORM1, ORM2, TNFRSF1B
	PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	1.74E-06	B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, IL2RA, PDCD1, TNFRSF1B
	Th1 and Th2 Activation Pathway	7.94E-06	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, ICOSLG/LOC102723996, IL2RA, LGALS9, NCSTN, TGFBR3, TIMD4
	Th2 Pathway	1.15E-05	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, ICOSLG/LOC102723996, IL2RA, NCSTN, TGFBR3, TIMD4
	FXR/RXR Activation	6.46E-05	AGT, APOC2, APOC3, FGA, LCAT, ORM1, ORM2
	Acute Phase Response Signaling	1.17E-04	AGT, CP, FGA, FTL, ORM1, ORM2, SERPINA3, TNFRSF1B
	Virus Entry via Endocytic Pathways	1.86E-04	B2M, CXADR, FLNA, HLA-A, HLA-B, HLA-C
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	2.63E-04	AGT, CFD, HLA-A, HLA-B, HLA-C, SERPINA3
	Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	3.31E-04	B2M, FLNA, HLA-A, HLA-B, HLA-C
	Th1 Pathway	3.55E-04	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, ICOSLG/LOC102723996, LGALS9, NCSTN
	Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	8.13E-04	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, TNFRSF1B
	Natural Killer Cell Signaling	9.33E-04	B2M, FCGR2A, HLA-A, HLA-B, HLA-C, LAIR1, PVR
	Protein Ubiquitination Pathway	1.48E-03	B2M, CRYAB, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HSP90AA1, HSPB11, SMO
	Coagulation System	2.69E-03	F9, FGA, PLAUR
	B Cell Development	2.95E-03	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA
	Neuroinflammation Signaling Pathway	3.16E-03	B2M, CD200, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, NCSTN, TGFBR3
	Atherosclerosis Signaling	3.39E-03	APOC2, APOC3, LCAT, ORM1, ORM2
	Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	4.27E-03	VPS28, VPS36, VPS4A

（3） F3 患者尿蛋白质组分析

将 F3 患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 65 个差异蛋白，分别有 50 个上调蛋白和 15 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 分析，获得的经典途径结果如表 4 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在急性期反应、LXR/RXR 激活、FXR/RXR 激活、补体系统、吞噬体成熟、慢性阻塞性肺疾病的气道病理、膀胱癌信号、基质金属蛋白酶的抑制、动脉粥样硬化信号、尿嘧啶降解、胸腺嘧啶降解、甲状腺激素的生物合成、卵巢癌信号、肿瘤微环境等信号通路。同样，最显著相关的前几个通路都表示出了与炎症相关。

表 4 F3 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	**P-value**	**Molecules**
F3	Acute Phase Response Signaling	7.76E-08	C3, C9, CRP, FGG, HPX, LBP, ORM1, ORM2
	LXR/RXR Activation	1.86E-06	C3, C9, HPX, LBP, ORM1, ORM2
	FXR/RXR Activation	3.72E-05	C3, C9, HPX, ORM1, ORM2
	Complement System	1.74E-04	C3, C9, CFH
	Phagosome Maturation	1.05E-03	CTSC, CTSD, CTSH, CTSZ
	Airway Pathology in Chronic Obstructive	4.79E-03	MMP2, ORM1, ORM2

	Pulmonary Disease		
	Bladder Cancer Signaling	4.90E-03	MMP2, MMP7, THBS1
	Inhibition of Matrix Metalloproteases	5.89E-03	MMP2, MMP7
	Atherosclerosis Signaling	6.46E-03	ORM1, ORM2, PLA2G2A
	Uracil Degradation II (Reductive)	8.91E-03	DPYS
	Thymine Degradation	8.91E-03	DPYS
	Thyroid Hormone Biosynthesis	8.91E-03	CTSD
	Ovarian Cancer Signaling	1.15E-02	FSHB, MMP2, MMP7
	Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1.55E-02	MMP2, MMP7, PF4
	Tumor Microenvironment Pathway	1.66E-02	IGF2, MMP2, MMP7
	Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	1.78E-02	DAG1, LAMC1
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1.95E-02	IGF2, LBP, MMP2
	Adrenomedullin signaling pathway	2.09E-02	C3, CFH, MMP2
	Ceramide Degradation	2.09E-02	ASAH1
	Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	2.14E-02	MMP2, MMP7, PF4

（4） F4 患者尿蛋白质组分析

将 F4 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 440 个差异蛋白，分别有 279 个上调蛋白和 161 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 5 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在网格蛋白介导的内吞作用、上皮黏附连接信号、上皮黏附连接重塑、BAG2 信号通路、突触发生信号通路、神经元 reelin 信号、糖酵解途径等，同时还具有和 F1、F2、F3 样本相同的急性炎症相关的通路。

表 5 F4 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	**P-value**	**Molecules**
F4	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	3.16E-16	ACTA1, ACTG1, ACTR2, ACTR3, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC1, APOC2, APOC3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, CDC42, CLTC, DNM2, F2, HSPA8, MYO6, ORM1, ORM2, SAA4, WASL
	Epithelial Adherens Junction Signaling	6.31E-11	ACTA1, ACTG1, ACTN4, ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, BAIAP2, CDC42, CDH2, NECTIN1, NECTIN3, NOTCH2, PTPRM, WASL
	Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	6.46E-10	ACTA1, ACTG1, ACTN4, ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, DNM2
	BAG2 Signaling Pathway	8.71E-10	CTSB, HSP90AA1, HSPA4, HSPA8, MAPT, PSMA4, PSMA6, PSMA7, PSMC2, PSMC3, PSMC5, PSMC6, PSMD2, PSME1
	Synaptogenesis Signaling Pathway	4.57E-09	ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, CADM1, CDC42, CDH16, CDH2, CFL1, EFNA1, EFNA2, EFNA4, EPHA1, EPHB4, HSPA8, MAPT, NECTIN1, NECTIN3, STXBP2, WASL
	Reelin Signaling in Neurons	5.25E-09	ACTR2, ACTR3, APP, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, CDC42, CDH2, CFL1, MAPT, NECTIN3, WASL
	Glycolysis I	1.51E-08	ALDOB, ENO1, FBP1, GAPDH, GPI, PFKL, PFKM, PGK1
	RhoA Signaling	2.75E-08	ACTA1, ACTG1, ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, BAIAP2, CFL1, CFL2, EPHA1

	Acute Phase Response Signaling	4.27E-08	A2M, APOA1, APOA2, C1QC, C3, CRP, F2, FGB, FGG, FTL, IL1RAP, IL6ST, ITIH2, ORM1, ORM2, RBP5, SAA4, VWF
	Regulation of Actin-based Motility by Rho	5.13E-08	ACTA1, ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, BAIAP2, CDC42, CFL1, WASL
	Ephrin Receptor Signaling	1.45E-07	ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, CDC42, CFL1, CFL2, EFNA1, EFNA2, EFNA4, EPHA1, EPHB4, WASL
	LXR/RXR Activation	2.14E-07	APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC1, APOC2, APOC3, C3, IL1RAP, KNG1, LCAT, ORM1, ORM2, SAA4
	FXR/RXR Activation	2.63E-07	APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC1, APOC2, APOC3, C3, FBP1, KNG1, LCAT, ORM1, ORM2, SAA4
	Atherosclerosis Signaling	2.88E-07	APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC1, APOC2, APOC3, COL1A2, COL5A3, CSF1, LCAT, ORM1, ORM2, SAA4
	Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	3.16E-07	ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, BAIAP2, CDC42, WASL
	Rho GDI Signaling	3.72E-07	ACTA1, ACTG1, ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, CD44, CDC42, CDH16, CDH2, CFL1, CFL2, WASL
	Coagulation System	3.98E-07	A2M, F2, F5, FGB, FGG, KNG1, TFPI, VWF
	Phagosome Maturation	3.98E-07	ATP6AP2, ATP6V0A1, ATP6V1G1, ATP6V1H, CANX, CTSA, CTSB, CTSC, CTSH, CTSS, CTSZ, DYNC1H1, HLA-DRA, HLA-DRB1, VPS37B
	Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3.98E-07	ACTA1, ACTG1, ACTR2, ACTR3, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5, ARPC5L, CDC42
	Gluconeogenesis I	4.79E-07	ALDOB, ENO1, FBP1, GAPDH, GPI, MDH1, PGK1

（5） F5 患者尿蛋白质组分析

将 F5 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 184 个差异蛋白，分别有 143 个上调蛋白和 41 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 6 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在吞噬体成熟、硫酸软骨素降解、Ephrin 受体信号、铁稳态信号通路、MAPK 信号在促进流感发病机制中的作用、鞘氨醇 1-磷酸信号、轴突引导信号、Rho 信号等。

表 6 F5 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F5	Phagosome Maturation	1.58E-14	ATP6V0A4, ATP6V1A, ATP6V1B1, ATP6V1E1, ATP6V1G1, ATP6V1H, CTSA, CTSB, CTSC, CTSD, CTSH, CTSS, CTSZ, HLA-DRA, HLA-DRB1, LAMP1, PRDX5
	Chondroitin Sulfate Degradation (Metazoa)	8.71E-08	ARSB, GALNS, GM2A, HEXA, HEXB
	Ephrin Receptor Signaling	1.38E-06	CDC42, EFNA2, EFNA4, EPHA1, EPHB2, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, PTPN13, RAP1A
	Iron homeostasis signaling pathway	2.51E-06	ATP6V0A4, ATP6V1A, ATP6V1B1, ATP6V1E1, ATP6V1G1, ATP6V1H, HSPA9, PDGFRB, SMAD3
	Role of MAPK Signaling in Promoting the Pathogenesis of	5.01E-06	ATP6V0A4, ATP6V1A, ATP6V1B1, ATP6V1E1, ATP6V1G1, ATP6V1H, LCAT, RAP1A

	Influenza		
	Sphingosine-1-phosphate Signaling	7.41E-06	ASAH1, CDC42, GNA13, GNAI3, GNAQ, PDGFRB, RHOF, SMPD1
	Sperm Motility	9.77E-06	AXL, EPHA1, EPHB2, FRK, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, LCAT, PDGFRB, TYRO3
	Ephrin B Signaling	3.80E-05	CDC42, EPHB2, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ
	RhoA Signaling	9.55E-05	BAIAP2, EPHA1, EZR, GNA13, MSN, PFN2, RDX
	Axonal Guidance Signaling	9.77E-05	ADAM9, BAIAP2, CDC42, CHP1, EFNA2, EFNA4, EPHA1, EPHB2, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, PFN2, RAP1A
	Gαq Signaling	1.00E-04	CDC42, CHP1, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, PLD3, RHOF
	RhoGDI Signaling	1.02E-04	CDC42, EZR, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, MSN, RDX, RHOF
	Signaling by Rho Family GTPases	1.12E-04	BAIAP2, CDC42, EZR, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, MSN, RDX, RHOF
	Systemic Lupus Erythematosus In T Cell Signaling Pathway	1.26E-04	CDC42, CHP1, EZR, GNA13, GNAI3, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICOSLG/LOC102723996, MSN, RAP1A, RDX, RHOF
	G Beta Gamma Signaling	1.35E-04	CDC42, DNM2, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, RAP1A
	fMLP Signaling in Neutrophils	1.45E-04	CDC42, CHP1, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, RAP1A
	Apelin Endothelial Signaling Pathway	2.04E-04	AQP2, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, RAP1A, SMAD3
	Dermatan Sulfate Degradation (Metazoa)	2.69E-04	GM2A, HEXA, HEXB
	Relaxin Signaling	3.47E-04	ENPP6, GDPD3, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, RAP1A
	IL-8 Signaling	4.68E-04	CDC42, GNA11, GNA13, GNAI3, GNAQ, PLD3, RAP1A, RHOF

（6） F6 患者尿蛋白质组分析

将 F6 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 456 个差异蛋白，分别有 298 个上调蛋白和 158 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 7 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在 LXR/RXR 激活、FXR/RXR 激活、吞噬体成熟、急性期反应、凝固系统、抗原呈递途径、内在凝血酶原激活途径、肝纤维化/肝星状细胞活化、树突状细胞与自然杀伤细胞交叉、THOP1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用、外源性凝血酶原激活途径、Th2 途径、Th1 和 Th2 激活途径、病毒从宿主细胞退出的机制、动脉粥样硬化信号、树突状细胞成熟途径、B 细胞发育等。

表 7 F6 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	**P-value**	**Molecules**
F6	LXR/RXR Activation	7.94E-15	A1BG, AGT, AMBP, APOC2, APOC3, C4A/C4B, CD14, CETP, FGA, GC, HPX, IL1R2, ITIH4, KNG1, LBP, LCAT, ORM1, ORM2, RBP4, SERPINA1, TF, TNFRSF1A
	FXR/RXR Activation	1.26E-12	A1BG, ABCC2, AGT, AMBP, APOC2, APOC3, C4A/C4B, CETP, FETUB, FGA, GC, HPX, ITIH4, KNG1, LCAT, ORM1, ORM2, RBP4, SERPINA1, TF
	Phagosome Maturation	3.98E-12	ATP6V1B1, B2M, CALR, CANX, CTSA, CTSB, CTSC, CTSD, CTSH, CTSL, CTSS, CTSZ, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, LAMP1, TSG101, VPS28, VPS37B

	Acute Phase Response Signaling	5.01E-12	AGT, AMBP, C2, C4A/C4B, CFB, CP, CRP, FGA, FTL, HPX, IL6ST, ITIH4, LBP, ORM1, ORM2, PLG, RBP4, RBP5, SERPINA1, SERPINA3, SOD2, TF, TNFRSF1A
	Coagulation System	1.41E-09	F10, F5, F9, FGA, KNG1, PLAUR, PLG, PROS1, SERPINA1, SERPINC1
	Antigen Presentation Pathway	3.47E-09	B2M, CALR, CANX, CD74, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, PDIA3
	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.58E-06	COL1A1, F10, F5, F9, FGA, KNG1, PROS1, SERPINC1
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.14E-06	AGT, CCN2, CD14, COL1A1, COL6A3, ICAM1, IFNAR2, IGF2, IGFBP3, IL1R2, LBP, PDGFRA, PDGFRB, TIMP2, TNFRSF1A, VCAM1
	Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	2.63E-06	CD83, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM3, IL2RB, LTBR, NECTIN2, TLN1
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	3.09E-06	AGT, CFD, DPP4, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HPN, HTRA3, KNG1, PLG, PRSS8, SERPINA3
	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.29E-05	F10, F5, FGA, PROS1, SERPINC1
	Th2 Pathway	2.00E-05	DLL1, HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM1, ICOSLG/LOC102723996, IL2RB, NCSTN, NOTCH2, TGFBR3, TIMD4
	Th1 and Th2 Activation Pathway	4.37E-05	DLL1, HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM1, ICOSLG/LOC102723996, IL10RB, IL2RB, NCSTN, NOTCH2, TGFBR3, TIMD4
	PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	5.25E-05	B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, IL2RB, PDCD1, PDCD1LG2, TNFRSF1A
	Iron homeostasis signaling pathway	9.77E-05	ATP6V1B1, CP, FTH1, FTL, GDF15, HJV, HPX, PDGFRA, PDGFRB, SLC39A14, TF
	Th1 Pathway	1.51E-04	DLL1, HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM1, ICOSLG/LOC102723996, IL10RB, NCSTN, NOTCH2
	Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	1.78E-04	CHMP2B, CHMP4C, PDCD6IP, TSG101, VPS28, VPS4A
	Atherosclerosis Signaling	2.82E-04	APOC2, APOC3, COL1A1, ICAM1, LCAT, ORM1, ORM2, RBP4, SERPINA1, VCAM1
	Dendritic Cell Maturation	4.68E-04	B2M, CD58, CD83, COL1A1, FCGR2A, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM1, IGHG2, IGHG3, IGLC3, LTBR, LY75, PDIA3, TNFRSF1A
	B Cell Development	7.94E-04	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, HLA-DRB1, IGHM

（7） F7 患者尿蛋白质组分析

将 F7 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 170 个差异蛋白，分别有 153 个上调蛋白和 17 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 8 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在吞噬体成熟、LXR/RXR 激活、FXR/RXR 激活、乳糖降解、吞噬体形成、动脉粥样硬化信号、网格蛋白介导的内吞信号、巨噬细胞中 IL-12 的信号转导和生成、1-磷酸鞘氨醇信号、维生素 C 运输途径、上皮黏附连接的重塑、巨噬细胞中一氧化氮和活性氧的产生、Caveolar 介导内吞蛋白信号、左卡尼汀生物合成等。

表 8 F7 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F7	Phagosome Maturation	2.82E-06	ATP6V0A1, CTSA, CTSH, CTSS, HLA-C, HLA-DRA, LAMP1, RAB7A, TUBB4B
	LXR/RXR Activation	5.50E-05	APOC1, APOC2, C9, IL18, LBP, LCAT, PCYOX1
	FXR/RXR Activation	4.68E-04	APOC1, APOC2, C9, IL18, LCAT, PCYOX1
	Lactose Degradation III	6.03E-04	GLB1, PSAP
	Phagosome Formation	7.94E-04	C3AR1, CDC42, CLEC7A, FCAMR, MRC2, RHOF
	Atherosclerosis Signaling	3.24E-03	APOC1, APOC2, IL18, LCAT, PCYOX1
	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	4.17E-03	APOC1, APOC2, CDC42, DNM2, PCYOX1, RAB7A
	IL-12 Signaling and Production in Macrophages	4.17E-03	APOC1, APOC2, IL18, PCYOX1, RAB7A
	PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	8.91E-03	HLA-C, HLA-DRA, IL2RA, PDCD1
	Th1 and Th2 Activation Pathway	1.05E-02	HLA-DRA, IL18, IL2RA, LGALS9, NCSTN
	Sphingosine-1-phosphate Signaling	1.29E-02	ASAH1, CDC42, PDGFRB, RHOF
	Th1 Pathway	1.38E-02	HLA-DRA, IL18, LGALS9, NCSTN
	Vitamin-C Transport	1.41E-02	SLC23A1, STOM
	Acute Phase Response Signaling	1.51E-02	C9, CRP, FTL, IL18, LBP
	Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	1.51E-02	DNM2, RAB7A, TUBB4B
	Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	1.66E-02	CDC42, LAMB1, LAMC1
	Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	1.66E-02	APOC1, APOC2, CDC42, PCYOX1, RHOF
	Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	2.14E-02	DNM2, FLOT1, HLA-C
	L-carnitine Biosynthesis	2.34E-02	BBOX1
	LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	3.02E-02	ALDH2, APOC1, APOC2, IL18, LBP

（8） F8 患者尿蛋白质组分析

将 F8 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 563 个差异蛋白，分别有 460 个上调蛋白和 103 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 9 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在肝纤维化/肝星状细胞活化、LXR/RXR 激活、吞噬体成熟、内在凝血酶原激活途径、动脉粥样硬化信号、急性期反应、铁稳态信号通路、NK 细胞信号、Apelin 肝信号通路、抗原呈递信号、FXR/RXR 激活、Th1 和 Th2 激活途径、Caveolar 介导内吞蛋白信号、Th2 信号通路、补体系统等。

表 9 F8 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F8	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1.26E-11	BAX, CCN2, CD14, CD40, COL15A1, COL18A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL5A3, COL6A3, FGFR1, IFNAR2, IGF2, IGFBP3, LBP, MMP9, PDGFRA, PDGFRB, TGFBR1, TIMP2, TNFRSF1A, TNFRSF1B, VCAM1
	LXR/RXR Activation	7.94E-08	APOC3, CD14, GC, HPX, KNG1, LBP, LCAT, LPL, MMP9, ORM1, ORM2, PLTP, RBP4, SERPINF2, TNFRSF1A, TNFRSF1B
	Phagosome Maturation	2.14E-07	ATP6AP1, ATP6V0A1, B2M, CANX, CTSA, CTSB, CTSD, CTSH, CTSS, CTSZ, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, LAMP1, PRDX5, VPS28

	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	6.31E-07	COL18A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A3, F10, F5, F9, KNG1
	Atherosclerosis Signaling	6.46E-07	APOC3, CD40, COL18A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A3, LCAT, LPL, MMP9, ORM1, ORM2, RBP4, TNFRSF12A, VCAM1
	Acute Phase Response Signaling	9.55E-07	C2, CFB, CP, CRP, FTL, GRB2, HPX, LBP, ORM1, ORM2, OSMR, RBP4, SERPINA3, SERPINF2, SERPING1, SOD2, TNFRSF1A, TNFRSF1B
	Iron homeostasis signaling pathway	6.61E-06	ATP6AP1, ATP6V0A1, BMP6, CD163, CP, FTH1, FTL, GDF15, HJV, HPX, PDGFRA, PDGFRB, SKP1, SLC39A14
	Natural Killer Cell Signaling	3.09E-05	B2M, COL18A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A3, FCGR2A, GRB2, HLA-A, HLA-B, HLA-C, IL2RB, LAIR1, LILRB1, PVR, ULBP2
	Apelin Liver Signaling Pathway	3.63E-05	COL18A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A3, PDGFRB
	Antigen Presentation Pathway	3.89E-05	B2M, CANX, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, PDIA3
	FXR/RXR Activation	7.41E-05	APOC3, GC, HPX, KNG1, LCAT, LPL, ORM1, ORM2, PCK2, PLTP, RBP4, SERPINF2
	Th1 and Th2 Activation Pathway	8.51E-05	CD40, GRB2, HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, ICOSLG/LOC102723996, IL10RB, IL2RA, IL2RB, LGALS9, NCSTN, NOTCH2, TGFBR1, TIMD4
	Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	9.55E-05	CD40, CD83, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, IL2RB, LTBR, TLN1, TNFRSF1B
	Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	1.07E-04	B2M, COPB2, DNM2, FLNA, FLNC, HLA-A, HLA-B, HLA-C, ITGB5
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	1.10E-04	APP, DPP4, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HTRA1, HTRA3, KNG1, MMP9, PRSS23, SERPINA3
	Th2 Pathway	1.35E-04	CD40, GRB2, HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, ICOSLG/LOC102723996, IL2RA, IL2RB, NCSTN, NOTCH2, TGFBR1, TIMD4
	Phagosome Formation	1.91E-04	C3AR1, CLEC7A, FCAMR, FCGR2A, IGHG3, IGHG4, IGLC3, ITGB5, MARCKS, MRC1, MRC2, PDIA3
	Coagulation System	2.14E-04	F10, F5, F9, KNG1, PLAUR, SERPINF2
	Complement System	2.51E-04	C2, C3AR1, C8G, CD46, CFB, SERPING1
	PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	2.63E-04	B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, IL2RA, IL2RB, PDCD1LG2, TNFRSF1A, TNFRSF1B

（9） F9 患者尿蛋白质组分析

将 F9 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 36 个差异蛋白，分别有 32 个上调蛋白和 4 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 10 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在原发性免疫缺陷信号、卵巢癌信号、B 细胞发育、自身免疫性甲状腺疾病信号转导、先天免疫和适应性免疫、THOP1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用、超氧化物自由基降解、树突状细胞的成熟、NFAT 在调节免疫反应中的作用、系统性红斑狼疮信号、松弛素信号、戊二酰辅酶 A 降解、急性期反应、GNRH 信号、B 细胞受体信号、JAK1、JAK2 和 TYK2 在干扰素信号转导中的作用、NRF2 介导的氧化应激反应等。

表 10 F9 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F9	Primary Immunodeficiency Signaling	4.79E-05	IGHG2, IGHM, IGLL1/IGLL5
	Ovarian Cancer Signaling	7.94E-05	CGA, FSHB, LHB, MMP9
	B Cell Development	1.29E-03	HLA-DRB1, IGHM
	Autoimmune Thyroid Disease Signaling	4.37E-03	CGA, HLA-DRB1, IGHG2
	Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	6.92E-03	HLA-DRB1, IGHG2, IGHM
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	1.17E-02	MMP9, SERPINA3
	Superoxide Radicals Degradation	1.17E-02	SOD1
	Dendritic Cell Maturation	1.55E-02	FCGR3A/FCGR3B, HLA-DRB1, IGHG2
	Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	1.58E-02	FCGR3A/FCGR3B, HLA-DRB1, IGHM
	Phagosome Formation	1.78E-02	FCGR3A/FCGR3B, IGHG2
	Systemic Lupus Erythematosus Signaling	1.95E-02	FCGR3A/FCGR3B, IGHG2, IGHM
	Phagosome Maturation	2.04E-02	HLA-DRB1, PRDX2
	Relaxin Signaling	2.09E-02	GDPD3, MMP9
	Glutaryl-CoA Degradation	2.51E-02	CA1
	Acute Phase Response Signaling	3.02E-02	FTL, SERPINA3
	GNRH Signaling	3.02E-02	FSHB, LHB
	B Cell Receptor Signaling	3.16E-02	IGHG2, IGHM
	Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	3.47E-02	CA1
	Role of JAK1,　JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	3.80E-02	CGA
	NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3.89E-02	FTL, SOD1

（10） F10 患者尿蛋白质组分析

将 F10 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 409 个差异蛋白，分别有 272 个上调蛋白和 137 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 11 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在 LXR/RXR 激活、FXR/RXR 激活、急性期反应、吞噬体成熟、抗原呈递信号通路、外源性凝血酶原激活途径、病毒从宿主细胞中退出的机制、抗坏血酸盐回收、Wnt 信号通路、动脉粥样硬化信号、Caveolar 介导内吞蛋白信号、NK 细胞信号等。

表 11 F10 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Molecules
F10	LXR/RXR Activation	7.94E-15	A1BG, AGT, AHSG, AMBP, APOC2, APOC3, C4A/C4B, C9, CD14, FGA, HPX, KNG1, LBP, LCAT, ORM1, ORM2, PLTP, RBP4, SERPINA1, TF, TNFRSF1A
	FXR/RXR Activation	1.58E-12	A1BG, AGT, AHSG, AMBP, APOC2, APOC3, C4A/C4B, C9, FETUB, FGA, HPX, KNG1, LCAT, ORM1, ORM2, PLTP, RBP4, SERPINA1, TF
	Acute Phase Response Signaling	2.51E-11	AGT, AHSG, AMBP, C4A/C4B, C9, CP, CRP, FGA, FTL, HP, HPX, LBP, ORM1, ORM2, PLG, RBP4, RBP5, SERPINA1, SERPINA3, TF, TNFRSF1A
	Phagosome Maturation	3.16E-11	ATP6V1B2, B2M, CALR, CANX, CTSA, CTSB, CTSC, CTSH, CTSS, CTSZ, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, RAB5C, TSG101, VPS28, VPS37B
	Coagulation System	9.77E-09	F10, F11, F5, F9, FGA, KNG1, PLG, SERPINA1, SERPINC1
	Antigen Presentation Pathway	2.14E-08	B2M, CALR, CANX, CD74, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-

			DRA, HLA-DRB1
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	9.33E-07	AGT, CFD, DPP4, F11, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HTRA1, HTRA3, KNG1, PLG, SERPINA3
	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	8.71E-06	F10, F11, F5, F9, FGA, KNG1, SERPINC1
	PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	1.17E-04	B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, IL2RB, PDCD1, TNFRSF1A
	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.70E-04	F10, F5, FGA, SERPINC1
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	2.09E-04	AGT, CD14, COL4A1, COL6A3, IFNAR2, IGF2, IGFBP4, LBP, PDGFRB, TIMP2, TNFRSF1A, VCAM1
	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	2.29E-04	APOC2, APOC3, CD2AP, DAB2, EPHB2, ORM1, ORM2, RAB5C, RBP4, SERPINA1, TF, TSG101
	LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	7.94E-04	ALDH1L1, ALDH2, APOC2, CD14, FABP1, FABP2, FABP3, FABP7, GSTO1, LBP, PLTP, TNFRSF1A
	Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	8.71E-04	CHMP4B, PDCD6IP, TSG101, VPS28, VPS4A
	Ascorbate Recycling (Cytosolic)	1.00E-03	GLRX, GSTO1
	Wnt/β-catenin Signaling	1.20E-03	CD44, CDH2, CDH3, CDH5, DKK3, FRZB, GNAQ, KREMEN1, SFRP4, SMO
	Atherosclerosis Signaling	2.29E-03	APOC2, APOC3, LCAT, ORM1, ORM2, RBP4, SERPINA1, VCAM1
	Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	2.51E-03	B2M, FLNC, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RAB5C
	Natural Killer Cell Signaling	3.09E-03	B2M, FCGR2A, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HSPA4, IL2RB, LAIR1, PVR, ULBP2
	Iron homeostasis signaling pathway	3.16E-03	ATP6V1B2, CP, FTL, GDF15, HP, HPX, PDGFRB, TF

（11） F11 患者尿蛋白质组分析

将 F11 号患者样本和 8 例健康样本组作比较，共鉴定到 294 个差异蛋白，分别有 217 个上调蛋白和 77 个下调蛋白。差异蛋白筛选条件为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05，差异蛋白的具体信息列在附表 1 中。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，获得的经典途径结果如表 12 所示。筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。差异蛋白富集到的信号通路主要表现在急性期反应、抗原呈递信号通路、THOP1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用、FAT10 信号通路、PD-1、PD-L1 肿瘤免疫治疗途径、多胺在结肠癌中的调节作用、BAG2 信号通路、蛋白质泛素化途径、吞噬体成熟、LXR/RXR 激活、B 细胞发育、ARE 介导的 mRNA 降解途径的抑制、Th2 信号通路、神经炎症信号通路、IL-17A 在银屑病中的作用、补体系统等。

表 12 F11 患者 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	**P-value**	**Molecules**
F11	Acute Phase Response Signaling	1.45E-10	AGT, APOH, C1R, C1S, C2, CP, CRP, FTL, IL6ST, ORM1, ORM2, PLG, RBP5, SERPINA3, SERPING1, SOD2, TNFRSF1B
	Antigen Presentation Pathway	6.92E-10	B2M, CANX, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, PDIA3, PSMB9
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	1.32E-07	AGT, C1R, DPP4, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HPN, KLK6, PLG, PRTN3, SERPINA3

	FAT10 Signaling Pathway	3.09E-07	PSMA1, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB4, PSMB9
	PD-1,　PD-L1 cancer immunotherapy pathway	6.03E-07	B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, IL2RB, PDCD1, PDCD1LG2, TNFRSF1B
	Polyamine Regulation in Colon Cancer	7.08E-07	PSMA1, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB4, PSMB9
	BAG2 Signaling Pathway	7.24E-06	PSMA1, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB4, PSMB9
	Protein Ubiquitination Pathway	7.24E-06	B2M, CRYAB, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HSPB11, PSMA1, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB4, PSMB9
	Phagosome Maturation	1.70E-05	B2M, CANX, CTSS, CTSZ, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, LAMP1
	LXR/RXR Activation	2.24E-05	A1BG, AGT, APOC1, APOH, CD14, ORM1, ORM2, S100A8, TNFRSF1B
	B Cell Development	7.59E-05	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, HLA-DRB1, IGHM
	Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	1.35E-04	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, IL2RB, TNFRSF1B
	Inhibition of ARE-Mediated mRNA Degradation Pathway	1.66E-04	PSMA1, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB4, PSMB9, TNFRSF1B
	Th2 Pathway	2.51E-04	HLA-A, HLA-B, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICOSLG/LOC102723996, IL2RB, NCSTN, TGFBR3
	Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	3.31E-04	B2M, COPB2, HLA-A, HLA-B, HLA-C, ITGB1
	Neuroinflammation Signaling Pathway	4.37E-04	B2M, CD200, CRP, CX3CL1, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, NCSTN, SOD2, TGFBR3
	Role of IL-17A in Psoriasis	6.17E-04	S100A7, S100A8, S100A9
	Huntington's Disease Signaling	6.76E-04	CAPN1, CAPNS1, GNAQ, PSMA1, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB4, PSMB9
	FXR/RXR Activation	9.33E-04	A1BG, ABCC2, AGT, APOC1, APOH, ORM1, ORM2
	Complement System	9.77E-04	C1R, C1S, C2, SERPING1

2.2 成组患者尿蛋白质组分析

一共收集了 11 位患者以及 8 位健康人的尿液样本进行质谱分析，一共鉴定到了 2812 种蛋白（FDR＜1%），蛋白鉴定要求至少两个特异肽段。经过筛选后共鉴定到 129 个差异蛋白，其中 20 个差异蛋白上调，109 个差异蛋白下调，差异蛋白的具体信息见附表 1。差异蛋白筛选标准为 FC≥2 或≤0.5，P＜0.05。

对筛选到的差异蛋白采用 Ingenuity Pathway Analysis 进行信号通路分析，筛选 P＜0.05 被认为是显著的信号通路。结果如表 12 所示，差异蛋白主要富集的信号通路有 STAT3 信号通路、SPINK1 信号通路、白细胞介素 15 的产生、吞噬体成熟等。其中，有文献报道 STST3 信号通路与细胞自噬有很大关系[10]，而白细胞介素 15 以及吞噬体成熟离不开机体的免疫系统。

我们对总蛋白进行了正交偏最小二乘法（OPLS-DA）分析，OPLS-DA 得分如图 1 所示，健康组和患者组的组间差异比较大，说明尿液蛋白质能够反映疾病状态所带来的差异；同时我们发现患者组的组内差异比较明显，这表示临床样本的个体差异性很大，再加上对比单人分析和成组分析得到的 IPA 分析结果可知，成组分析会掩盖个体的独立性，为我们单人分析的重大意义提供了理论依据。

表 12 发热待查患者成组 IPA 分析

	Ingenuity Canonical Pathways	**P-value**	**Molecules**

F	STAT3 Pathway	1.74E-04	EGF, FGFR1, FGFR3, GHR, IL2RB, PDGFRB
	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	3.47E-04	CPM, CTSA, CTSB, KLK1
	IL-15 Production	8.32E-04	EPHB3, ERBB4, FGFR1, FGFR3, PDGFRB
	Iron homeostasis signaling pathway	1.32E-03	CP, CREB3L3, EGF, FTL, PDGFRB
	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	6.03E-03	COL15A1, EGF, FGFR1, PDGFRB, TIMP2
	Synaptogenesis Signaling Pathway	1.12E-02	CADM1, CDH19, CREB3L3, EPHB3, EPHB6, NECTIN3
	Phagosome Maturation	1.29E-02	CTSA, CTSB, CTSC, CTSS
	PTEN Signaling	1.32E-02	FGFR1, FGFR3, GHR, PDGFRB
	FGF Signaling	1.45E-02	CREB3L3, FGFR1, FGFR3
	Sperm Motility	1.66E-02	EPHB3, ERBB4, FGFR1, FGFR3, PDGFRB
	Coagulation System	1.91E-02	KNG1, SERPINA5
	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2.57E-02	KLK1, KNG1
	Regulation Of The Epithelial Mesenchymal Transition By Growth Factors Pathway	2.95E-02	EGF, FGFR1, FGFR3, PDGFRB
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	3.02E-02	HGFAC, KLK1, KNG1
	Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	3.02E-02	EGF, FGFR1, FGFR3, PDGFRB
	Ephrin Receptor Signaling	3.31E-02	CREB3L3, EGF, EPHB3, EPHB6
	Ceramide Degradation	4.17E-02	ASAH1
	CNTF Signaling	4.57E-02	CNTFR, LIFR
	Adipogenesis pathway	4.68E-02	DLK1, FGFR1, FGFR3
	White Adipose Tissue Browning Pathway	4.90E-02	CREB3L3, FGFR1, FGFR3

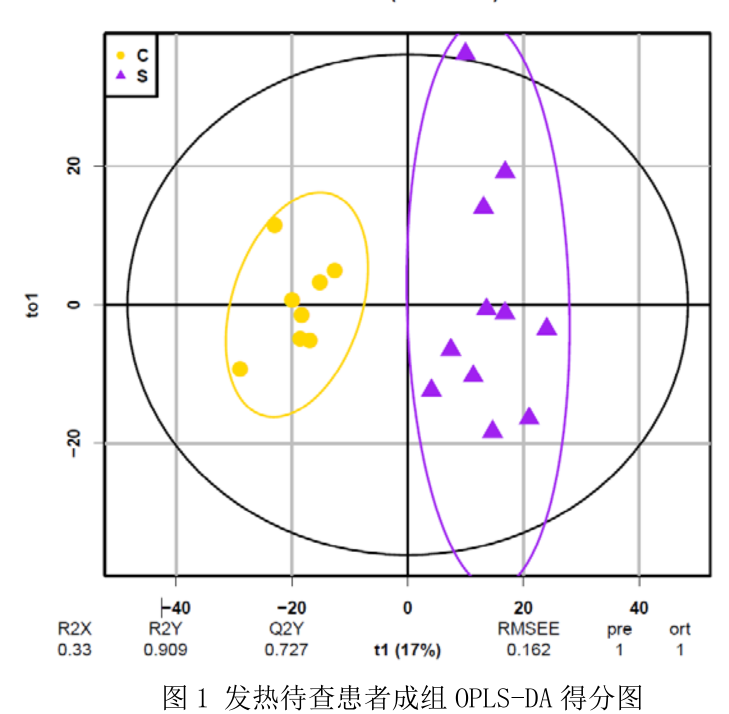


图 1 发热待查患者成组 OPLS-DA 得分图

2.3 单个样品独立分析和成组分析对比

通过比较一对多分析方法和成组分析方法的结果，我们可以观察到，成组分析的结果不能代表任何一个发热待查患者的特点，成组分析只能让我们看到发热待查患者的相同点，但实际上每一位发热待查患者都是独立存在的，我们无法单凭发热症状就将他们分在一组去分析，而且 11 例发热待查患者的分析结果也都不一样。值得一提的是，不管是一对多分析还是成组分析，我们都能从尿液中看到发热待查患者与健康样本之间存在的显著差异，这为尿液的临床诊断提供了理论依据，同时更能提醒我们，如果对于特定病人能有特定的符合对照要求的一组正常人做对照，这样比每个人都用同样的对照要更合适，比如年龄、性别、用药史相匹配等等。若是能和指标相匹配的群体做对比分析，应该更能得到准确的结果。

3　结论

本研究通过 LC-MS/MS 非标记定量的方法，对 11 例发热待查样本单人分析进行尿液差异蛋白的筛选，并进行生物学通路的分析，发现尿蛋白质组能够提供病人和健康人的区别。

同时在本研究中提出，一对多的研究方法能为发热待查患者提供个性化的线索。临床样本的个体差异性很容易被成组分析所掩盖，一对多分析更能突出病人的个体化，也是未来探索病人未知疾病线索的一个方法。

参考文献：

[1] Petersdorf, R.G. and P.B. Beeson, Fever of unexplained origin: report on 100 cases. Medicine, 1961. 40.

[2] Mulders-Manders, C., A. Simon, and C. Bleeker-Rovers, Fever of unknown origin. Clinical Medicine, 2015. 15(3): p. 280.

[3] Gao, Y., Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? Science China. Life sciences, 2013. 56(12): p. 1145-1146.

[4] Wu, J., Z. Guo, and Y. Gao, Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model. Cancer medicine, 2017. 6(11): p. 2713-2722.

[5] Wei, J., et al., Early urine proteome changes in the Walker-256 tail-vein injection rat model. Scientific reports, 2019. 9(1): p. 13804.

[6] Zhang, L., Y. Li, and Y. Gao, Early changes in the urine proteome in a diethyldithiocarbamate-induced chronic pancreatitis rat model. Journal of proteomics, 2018. 186.

[7] Wisniewski, J.R., et al., Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods, 2009. 6(5): p. 359-62.

[8] Koj, A., Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. Biochimica et biophysica acta, 1996. 1317(2): p. 84-94.

[9] van Diepen, J.A., et al., Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. Atherosclerosis, 2013. 228(2): p. 306-315.

[10] ou, L., et al., The role of STAT3 in autophagy. Autophagy, 2015. 11(5): p. 729-739.

作者贡献声明：

#表示共同第一作者

魏利龙，赵晨阳，高友鹤：提供样本，提出研究思路，设计研究方案；

赵晨阳，魏静：进行实验；

赵晨阳，魏静：论文数据分析；

赵晨阳：论文起草；

高友鹤：论文最终版本修订。